

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：31304

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08563

研究課題名(和文) CRF受容体1および2遺伝子改変マウスによるCRFニューロン回路の同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification of CRF neuronal circuitry in the brain using CRFR1-Cre and CRFR2-Cre mice

研究代表者

井樋 慶一 (Itoi, Keiichi)

東北福祉大学・健康科学部・教授

研究者番号：60232427

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：CRF受容体1 (CRFR1) 遺伝子またはCRF受容体2 (CRFR2) 遺伝子にCreリコンビナーゼをノックインしたマウス (CRFR1-CreおよびCRFR2-Cre) とGFP発現レポーターマウスを交配しGFP発現ニューロンの脳内分布が既報の結果と一致することを確認した。次に、CRFR1-CreとCre依存性のチャンネルロドプシン2またはCre依存性の陰イオンチャンネルロドプシン2発現マウスと交配し光ファイバーを脳内に留置し光励起した。CRFR1、または、CRFR2発現ニューロンを脳内部位別に活性化または抑制し、不安様行動、うつ様行動、および、摂食への影響が明らかにされた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

視床下部室傍核 (PVH) のCRFニューロンは視床下部 - 下垂体 - 副腎系の中枢であるが、CRFニューロンは正中隆起以外にも広範な脳内領域に投射し、PVH内で垂核を形成している。本研究ではCRFR1およびCRFR2発現ニューロンを脳内部位別に刺激または抑制し、PVH CRFニューロンが不安様行動うつ様行動、および摂食に関する脳内神経路を明らかにした。気分障害や神経性食思不振症などはストレスが発症・増悪因子であることから本研究の成果は将来ストレス関連疾患の新たな治療法・予防法の開発に寄与することができる。

研究成果の概要(英文)：A Cre-dependent GFP-expressing reporter mouse was crossed with either the CRFR1-Cre knock-in mouse or the CRFR2-Cre knock-in mouse, and it was verified that the distribution of GFP-expressing neurons in the brain recapitulated that of either CRFR1-expressing neurons or CRFR2-expressing neurons that were reported previously. Therefore, Cre recombination took place in accordance with the CRFR1 gene- and CRFR2 gene expression, respectively. Then, CRFR1-Cre and CRFR2-Cre were crossed with either the Cre-dependent ChR2-expressing- or the Cre-dependent ACR2-expressing mouse. ChR2 or ACR2 was excited by blue light via optic fibers implanted into discrete brain regions. Thus, CRFR1-expressing neurons or CRFR2-expressing neurons were stimulated or suppressed in separate brain regions. Anxiety-like behaviors, depression-like behaviors, or the effect on eating behavior was monitored and compared with those of control mice without light exposure.

研究分野：神経内分泌学

キーワード：遺伝子改変マウス 脳 ウイルスベクター 行動 摂食

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

視床下部室傍核 (PVH) の CRF 産生ニューロン (以下, CRF ニューロン) は視床下部 - 下垂体 - 副腎 (HPA) 系の中核であり, 副腎皮質の糖質コルチコイド合成・分泌を介してストレス防御にはたらくが, 我々は CRF ニューロンが正中隆起以外にも広範な脳内領域に投射することを明らかにした. CRF-Cre マウス (Itoi et al., *Endocrinology* 2014) の PVH に Cre 依存性 GFP 発現ウイルスを注入して PVH CRF ニューロンの走行を順行性にたどったところ, CRF ニューロンは正中隆起のほか, ストレス防御に関係の深い脳内領域に直接投射しており, 青斑核, 外側結合腕傍核, 背側縫線核, 中脳水道周囲灰白室, 延髄孤束核, 延髄腹外側網様核など脳幹部や外側視床下部, 視床室傍核が含まれる. さらに, PVH CRF ニューロンは PVH 内で垂核を形成しており, 正中隆起に投射する垂核はそれ以外に投射する垂核とは異なっていた. このように, PVH CRF ニューロンの脳内一次投射神経路の機能解析が進められてきているが, 脳内 CRF ニューロンがストレス防御に果たす役割を理解するためには, これらの一次投射領域より下流の神経路を明らかにし, 最終出力に至る脳内回路を同定することが必要である.

そこで, この課題に取り組むために我々は世界で初めて CRF 受容体 1 (CRFR1) 遺伝子) または CRF 受容体 2 (CRFR2) 遺伝子に Cre リコンビナーゼをノックインしたマウス (CRFR1-Cre および CRFR2-Cre) を開発した.

2. 研究の目的

PVH CRF ニューロンは種々の脳内神経核に投射し, 各投射路はそれぞれ特異的な脳内回路を形成し多彩な脳機能に關与する. PVH から一次投射領域に入力した信号は二次ニューロンに信号に伝達され, さらに二次ニューロンから複数のシナプスを經由して最終的な出力ニューロンの活動が制御されるもの考えられる. 二次ニューロンより下流の脳内回路を明らかにするために重要なのは, 一次ニューロンに発現する CRF 受容体の同定である. なぜなら, CRFR1 または CRFR2 によって現時点で性格の不明な二次ニューロンを標識し, それらの走行を追跡できるからである. そのために, 今回 CRFR1-Cre および CRFR2-Cre マウスを導入したが, たいへん都合なことに, これらのドライバーマウスは神経路トレーシングばかりでなく, ニューロン選択的光遺伝学にも用いることができるので, 二次ニューロンの機能を解析することができる. このように, PVH CRF ニューロンに起始する脳内神経回路を同定し, それらの生理的意義を解明することが本研究の目的である.

糖尿病, 高血圧, 関節リウマチ, 気管支喘息, 消化性潰瘍などの内科的疾患に加え気分障害や神経性食思不振症などの精神科疾患もストレスによって発症・増悪する. 本研究で得られた成果はストレス関連疾患の新たな治療法, 予防法の開発に寄与することが期待できる.

3. 研究の方法

本研究の目的を達成するため, CRFR1-Cre と Cre 依存性 GFP 発現レポーターマウス, あるいは, CRFR2-Cre と Cre 依存性 GFP 発現レポーターマウスを交配し, PVH CRF ニューロンの一次投射野において CRF 受容体を同定した. 次に, Cre 依存性に開口するチャンネルロドプシン発現マウスの作製を試みた. これらは, 相同組み換えにより ROSA26 遺伝子座に lox-STOP-lox チャンネルロドプシン遺伝子をノックインすることにより我々の研究室で独自に開発された. さらに, CRFR1 発現ニューロン選択的チャンネルロドプシン発現マウスおよび CRFR2 発現ニューロン選択的チャンネルロドプシン発現マウスを用い, 光遺伝学によって PVH CRF ニューロンの一次投射野において CRF 受容体発現二次ニューロンを刺激または抑制しそれらの機能的意義を明らかにした. 最後に, CRFR1-Cre および CRFR2-Cre Cre を用い, Cre 依存性順行性トレーサー発現 AAV ウイルスをこれらのマウスの PVH CRF ニューロン一次投射領域内に注入し, 二次ニューロンの走行および三次ニューロンを同定した.

4. 研究成果

CRFR1-Cre および CRFR2-Cre と Cre 依存性 GFP 発現レポーターマウスを交配し GFP 発現ニューロンの分布が既報の結果と一致することを確認した. したがって, Cre によるリコンビネーションが CRFR1 および CRFR2 発現ニューロン選択的に惹起された. 次に, CRFR1-Cre と Cre 依存性チャンネルロドプシン 2 (ChR2) または Cre 依存性陰イオンチャンネルロドプシン 2 (ACR2) 発現マウスと交配し, CRFR1 または CRFR2 発現ニューロン選択的に ChR2 または ACR2 を発現させた. これらのマウスの脳内領域ごとに光ファイバーを留置した後青色光で励

起し、これらを活性化または抑制した。このようにして、PVH CRF ニューロンが投射する脳内領域において CRFR1 または CRFR2 発現ニューロンを脳内領域選択的に活性化または抑制し、不安様行動、うつ様行動、および、摂食への影響が明らかにされた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Mukai Y, Li Y, Nakamura A, Fukatsu N, Iijima D, Abe M, Sakimura K, Itoi K, Yamanaka A.	4. 巻 13(1)
2. 論文標題 Cre-dependent ACR2-expressing reporter mouse strain for efficient long-lasting inhibition of neuronal activity.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 3966
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-30907-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ueda S, Hosokawa M, Arikawa K, Takahashi K, Fujiwara M, Kakita M, Fukada T, Koyama H, Horigane SI, Itoi K, Kakeyama M, Matsunaga H, Takeyama H, Bito H, Takemoto-Kimura S	4. 巻 14
2. 論文標題 Distinctive Regulation of Emotional Behaviors and Fear-Related Gene Expression Responses in Two Extended Amygdala Subnuclei With Similar Molecular Profiles.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front Mol Neurosci	6. 最初と最後の頁 741895
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnmol.2021.741895	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kawatani M, de Groat WC, Itoi K, Uchida K, Sakimura K, Yamanaka A, Yamashita T, Kawatani M	4. 巻 126
2. 論文標題 Downstream projection of Barrington's nucleus to the spinal cord in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Neurophysiol	6. 最初と最後の頁 1959-1977
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/jn.00026.2021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Hagiwara H, Sakimura K, Abe M, Itoi K, Kamiya Y, Akema T, Funabashi T	4. 巻 1773
2. 論文標題 Sex differences in pain-induced modulation of corticotropin-releasing hormone neurons in the dorsolateral part of the stria terminalis in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain Res	6. 最初と最後の頁 147688
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.brainres.2021.147688	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Uchida K, Hasuoka K, Fuse T, Kobayashi K, Moriya T, Suzuki M, Katayama N, Itoi K	4. 巻 11
2. 論文標題 Thyroid hormone insufficiency alters the expression of psychiatric disorder-related molecules in the hypothyroid mouse brain during the early postnatal period	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 6723
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-86237-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamagata S, Talukder AH, Murasawa S, Niioka K, Kumagai N, Takagi M, Kawamura M, Natsume R, Abe M, Uchida K, Sato T, Kurose A, Kageyama K, Daimon M, Sakimura K, Itoi K	4. 巻 168
2. 論文標題 Vasopressin Expressed in Hypothalamic CRF Neurons Causes Impaired Water Diuresis in Secondary Adrenal Insufficiency	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 bqad109
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/endo/bqad109	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamaguchi Y, Maekawa Y, Kabashima K, Mizuno T, Tainaka M, Suzuki T, Dojo K, Tominaga T, Kuroiwa S, Masubuchi S, Doi M, Tominaga K, Kobayashi K, Yamagata S, Itoi K, Abe M, Schwartz WJ, Sakimura K, Okamura H	4. 巻 120
2. 論文標題 An intact pituitary vasopressin system is critical for building a robust circadian clock in the suprachiasmatic nucleus	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A	6. 最初と最後の頁 e2308489120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2308489120	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Zhao C, Ries C, Du Y, Zhang J, Sakimura K, Itoi K, Deussing JM	4. 巻 17
2. 論文標題 Differential CRH expression level determines efficiency of Cre- and Flp-dependent recombination	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Front Neurosci	6. 最初と最後の頁 1163462
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnins.2023.1163462	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Sato T, Sugaya T, Talukder AH, Tsushima Y, Sasaki S, Uchida K, Sato T, Ikoma Y, Sakimura K, Fukuda A, Matsui K, Itoi K	4. 巻 35
2. 論文標題 Dual action of serotonin on local excitatory and inhibitory neural circuits regulating the corticotropin-releasing factor neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. J Neuroendocrinol	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Neuroendocrinol	6. 最初と最後の頁 e13351
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jne.13351	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	松井 広 (Matsui Ko) (20435530)	東北大学・生命科学研究科・教授 (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
ドイツ	Max Planck Institute of Psychiatry			
米国	University of Pittsburgh			